

Zur Bestimmung
der tryptischen Aktivität
in Fermentpräparaten

Wolfgang Koller

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. K. Zipf)
und dem Deutschen Arzneiprüfungsinstitut München
(Direktor: Prof. Dr. phil. F. Schlemmer)

ZUR BESTIMMUNG DER TRYPTISCHEN AKTIVITÄT

IN FERMENTPRÄPARATEN



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Wolfgang Koller
aus
Stockach/Baden

München 1958

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Z i p f

Referent: Professor Dr. K. Z i p f

Tag der Promotion: 26. Februar 1958

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung	1
I. Allgemeiner Teil: Proteolytische Verdauung	2
II. Methoden zur Bestimmung der tryptischen Aktivität und bisherige Ergebnisse	5
III. Eigene Untersuchungen	12
IV. Experimenteller Teil	21
V. Diskussion	29
VI. Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	33
Lebenslauf	37



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555227_0083

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Einleitung

Im Interesse eines geordneten Arzneimittelwesens und einer rationellen Arzneitherapie sollen Arzneimittel eine konstante Zusammensetzung nach Art und Menge der Wirkstoffe und einen konstanten Wirkungswert besitzen. Man sucht diesen Forderungen durch chemische oder pharmakologische Bestimmung und Standardisierung des Wirkstoffgehaltes zu genügen.

Für Fermentpräparate, die zur Substitutionstherapie von Verdauungsstörungen infolge enzymatischer Insuffizienz des Magendarmkanals angewendet werden, ist eine einheitliche Standardisierung bis jetzt noch nicht erfolgt und auch vom Gesetzgeber nicht verlangt. Dementsprechend ist gerade auf diesem Gebiet eine große Zahl von unkontrollierten Präparaten im Arzneihandel, die Verdauungsfermente tierischer oder pflanzlicher Herkunft enthalten. Angaben über den Wirkungswert eines Präparates werden leider nur von wenigen Herstellern gegeben, und auch diese sind nicht einheitlich.

Es erschien deshalb zweckdienlich, die im Handel befindlichen Fermentpräparate auf ihren Gehalt an Fermenten bzw. deren Wirkungswert zu untersuchen. Gleichzeitig sollte versucht werden, die wichtigsten Methoden nach Möglichkeit untereinander zu vergleichen, auf ihre Leistungsgrenzen und Fehlerquellen hinzuweisen und damit dem Gesetzgeber geprüfte Unterlagen zur Auswahl von Testmethoden für Fermentpräparate zu liefern.

Die Verdauungsfermente umfassen drei große Gruppen: Proteasen, Amylasen und Lipasen. Das Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät und das Deutsche Arzneiprüfungsinstitut in München führen seit einiger Zeit systematische Untersuchungen dieser Enzyme in Fermentpräparaten des Handels durch.

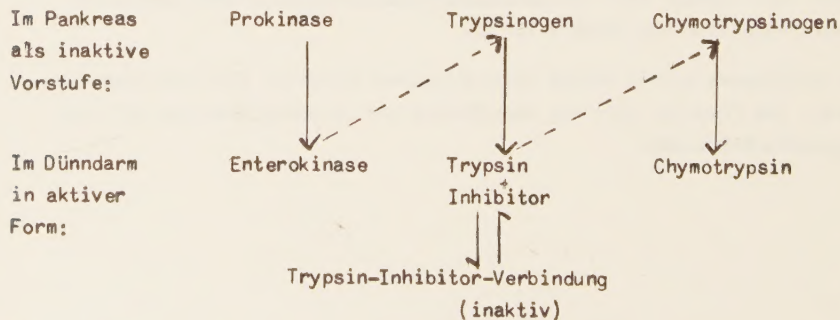
Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einem wichtigen Vertreter der Proteasen, dem Trypsin, also mit der Prüfung von Handelspräparaten auf ihre tryptische Aktivität.

I. Allgemeiner Teil: Proteolytische Verdauung

Das Nahrungseiweiß wird durch die verschiedenen Proteasen des Magen-Darm-Kanales angegriffen und durch diese bis zu wasserlöslichen und resorbierbaren Bruchstücken zerlegt. Die allgemeine Aufgabe der proteolytischen Fermente ist die Lösung der Säureamid-Bindungen im Eiweißmolekül, wobei jedoch die Spaltung der Peptidbindungen nicht willkürlich am hochmolekularen Eiweiß einsetzt. In sich ergänzendem Vorgang bauen die proteolytischen Fermente vielmehr an zwei verschiedenen Angriffspunkten Eiweiß ab. Eine Gruppe der Enzyme, die Endopeptidasen (M. BERGMANN, 1), lösen zentrale Peptidbindungen. Sie zerlegen das native Eiweiß in größere Bruchstücke (Polypeptide). Die Exopeptidasen (M. BERGMANN, 1) als zweite Gruppe der Fermente spalten die erhaltenen Bruchstücke in Aminosäuren auf.

Schon im Magen verdauen in Gegenwart von Salzsäure die Endopeptidasen Pepsin und Kathepsin die meisten Eiweißarten zu Polypeptiden. Nach Übertritt des Speisebreies in das Duodenum findet nach Umschlag des pH in den alkalischen Bereich in Gegenwart des Pankreassaftes die weitere Proteolyse des vorverdauten Eiweißes statt. Die eiweißspaltende Wirksamkeit des Pankreassekretes wird versinnbildlicht mit dem Ausdruck "Trypsin"; darunter versteht man den Enzymkomplex verschiedener Endo- und Exopeptidasen.

Unter den Endopeptidasen spielen die Fermente Trypsin und Chymotrypsin eine entscheidende Rolle. Diese Enzyme, die in inaktiver Form im Pankreas sezerniert werden, unterliegen einer komplizierten Aktivierung und Hemmung, deren Vorgänge in folgendem, von B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ (2) stammendem Schema zum Ausdruck kommen (Tabelle): x)



x) —————> geht über in

- wirkt ein auf

Eine besondere Form der Aktivierung ist autokatalytischer Natur: kleinste Trypsinmengen vermögen beliebige Mengen Trypsinogen zu aktivieren. Unterstützend wirken hierbei Magnesiumsulfat, Ammoniumsulfat und vor allem Calciumionen (HOPPE-SEYLER-THIERFELDER, 3). Die aktive Endopeptidase Trypsin unterscheidet sich dadurch von dem Pepsin des Magens, daß sie auf elektro-negatives Eiweiß einwirkt. Dies drückt sich in ihrer optimalen Wirksamkeit bei pH 7,5 - 10,2 aus (J.H. NORTHROP und M. KUNITZ, 4). Trypsin spaltet die meisten der gewöhnlichen Eiweißstoffe, jedoch wird die proteolytische Wirkung durch Vorverdauung mit Pepsin oder Denaturierung dieser Proteine stark erhöht (B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ, 2). Trypsin greift in der Regel lebendes Gewebe, lebende Ascariden, lebende Bakterien nicht an, wohl aber, wenn beispielsweise das Gewebe durch Histamin geschädigt wurde (C.A. DRAGSTEDT, 5). Substituierte Peptide (z.B. Benzoyl-L-Argininäthylester) werden von kristallisiertem Trypsin zerlegt.

Die Verdauung durch die Endopeptidase Chymotrypsin erstreckt sich vor allem auf die Abbauprodukte der Pepsin- und Trypsinverdauung. Chymotrypsin koagulierte im Gegensatz zu Trypsin Milch sehr stark. Das pH-Optimum des Chymotrypsins liegt bei pH 8.

Zu den Exopeptidasen des Pankreas rechnet man die Aminopolypeptidasen und die Carboxypolypeptidasen, deren Eiweißspaltung vom freien Amino- bzw. Carboxylende aus einsetzt. Sie bauen Polypeptide vom Tripeptid einschließlich aufwärts ab, greifen aber weder natives Eiweiß noch Dipeptide an. Ihre optimale Wirksamkeit liegt zwischen pH 7 und pH 8. Die Aufspaltung der Dipeptide in Aminosäuren erfolgt schließlich durch die Dipeptidasen, die sich sowohl im Pankreas als auch besonders reichlich im Dünndarm finden.

In die Gruppe der Fermente, die zur Substitutionstherapie bei Pankreasinsuffizienz und anderen fermentativen Verdauungsstörungen herangezogen werden, gehören auch die Enzyme verschiedener pflanzlicher Zellen und Milchsäfte sowie die Fermente verschiedener Hefen und Schimmelpilze. Ihr wesentlichster Unterschied zu den tierischen Proteasen dürfte nach B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ (2) darin bestehen, daß es sich hier im Gegensatz zu den sezernierten Enzymen (Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin) um typische intrazelluläre Endoenzyme handelt. Ihre physiologische Bedeutung bezieht sich somit auch mehr auf die Regulation des Eiweißstoffwechsels der Zellen, während Pepsin und Trypsin in erster Linie Verdauungsfermente sind.

Am bekanntesten unter den pflanzlichen Endopeptidasen ist das Ferment Papain, das durch fraktionierte Ausfällung aus dem Milchsaft des tropischen Melonen-

baumes (*Carica Papaya* L.) gewonnen werden kann. Durch das Ferment werden alle hochmolekularen natürlichen Eiweißstoffe gespalten. Das pH-Optimum des Papains liegt je nach Substrat und Versuchsbedingungen in weiten Grenzen. Papain greift bei seiner Verdauungstätigkeit die Eiweißstoffe mit großer Wahrscheinlichkeit als Zwitterionen an (B. FLASCHENTRÄGER und E. LEHNARTZ, 2). Der isoelektrische Punkt des entsprechenden Substrates dürfte somit im Gegensatz zu Trypsin und Pepsin für Papain und die pflanzlichen Endopeptidasen die günstigste Vorbedingung für die Verdauung sein.

Die Proteasen von Hefen und Schimmelpilzen zeigen in ihrem proteolytischen Verhalten große Übereinstimmung mit dem Papain. Nach E. BAMANN und K. MYR-BÄCK (6) kommen in der Hefe neben Endopeptidasen auch große Mengen Exopeptidasen vor. Nach denselben Autoren (6) wurde in folgenden Schimmelpilzen Trypsin gefunden: *Monilia*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium glaucum*, *Polyporus abietinus*. Die Aspergillazeen stellen den Hauptanteil der Pilze, in denen Proteasen nachgewiesen wurden.

Die richtige Zusammensetzung des Dünndarmsaftes ist für die Verdauungsvorgänge von entscheidender Bedeutung. Verdauungsstörungen im Duodenum in Form von schlechter Nahrungsausnutzung und Durchfällen sind häufig auf eine mangelhafte Sekretion der Pankreasfermente zurückzuführen. Es können bei Ausfall der proteolytischen Komponente der Bauchspeicheldrüse nach F. GROSSE-BROCK-HOFF (7) bis 50 % des Nahrungseiweißes dem Körper verlorengehen. In solchen Fällen muß die Therapie auf spezifisch wirksame und in ihrem Fermentgehalt genau bekannte Substitutionspräparate zurückgreifen können.

II. Methoden zur Bestimmung der tryptischen Aktivität und bisherige Ergebnisse

Für die Untersuchung pharmazeutischer Pankreaspräparate sind Hand in Hand mit den Fortschritten der Enzymchemie zahlreiche und verschiedenartige Testmethoden entwickelt worden. Die Folge dieser Entwicklung war die Aufstellung einer Anzahl biologischer Einheiten, deren Aussagen über die Wirkstoffe recht unterschiedlich sind. Das Fehlen von Übereinkünften über geeignete Testverfahren, internationale Einheiten und Standardsubstanzen wirkte dabei sehr ungünstig auf die Zahl der benutzten Einheiten und deren Vergleichbarkeit.

Bei der Herstellung von Pankreaspräparaten werden in der Regel die wäßrigen Auszüge der Bauchspeicheldrüse in gewissen Kombinationen auch der Milchsaft der Früchte des Melonenbaumes sowie Schimmelpilzproteasen verwendet. Bei den zu untersuchenden Präparaten handelt es sich somit immer um Fermentgemische. Die Isolierung und stoffliche Darstellung des proteolytischen Komplexes stoßen daher auf große Schwierigkeiten und können somit kaum zur Prüfung der Präparate herangezogen werden. Jedoch ist die Wirkung der in den Gemischen enthaltenen Enzyme einer Bestimmung zugänglich. Als Einheit der Enzymmenge kann eine bestimmte Verdauungsaktivität gewählt werden und die Zahl der Enzymeinheiten pro Gewichtseinheit Enzympräparat als ein Maß des Reinheitsgrades angesehen werden.

Unter den gebräuchlichen Prüfverfahren für proteolytische Fermente stehen an erster Stelle die Bestimmungsmethoden der verschiedenen Pharmacopoen. Es handelt sich dabei meist um Grenzwertbestimmungen, wobei das zu untersuchende Präparat eine gewisse Mindestforderung erfüllen muß. Quantitative Aussagen über die Verdauungsleistung eines Präparates außerhalb des Grenzwertbereiches können mit diesen Methoden nicht gemacht werden.

Im Ergänzungsbuch zum DAB 6 ist eine Prüfung der proteolytischen Wirksamkeit von Pankreatinum und entsprechender Präparate enthalten. Die zu prüfende Substanz soll Kuhmilch in einer bestimmten Zeit soweit peptonisieren, daß nach Zusatz von Salpetersäure eine Eiweißkoagulation nicht mehr eintritt.

In der Pharmacopoea Helvetica Editio Quinta erfolgt die Prüfung an einer Kaseinsubstrat- und Kaseinvergleichslösung. Nach Einwirkung der Fermentlösung auf die Kaseinsubstratlösung in einer festgelegten Zeit wird die Verdauung durch Zusatz von Essigsäure unterbrochen. Das noch nicht abgebaute Kasein fällt aus und ergibt eine Trübung. Die Kaseinvergleichslösung wird als Leerwert derselben Behandlung unterzogen. Die Trübung der Verdauungsprobe darf höchstens gleichstark sein wie diejenige der Vergleichsprobe.

Das Verfahren des Schweizer Arzneibuches ist aus der FULD-GROSS'schen Methode (8) hervorgegangen. In dieser Reihemethode verdauen absteigende Fermentmengen eine standardisierte Kaseinlösung. Das nicht abgebaute Kasein wird mit wässrig-alkoholischer Essigsäure ausgefällt. Die FULD-GROSS-Einheit bezeichnet diejenige Enzymmenge, die innerhalb einer Stunde unter festgelegten Bedingungen 1 mg Kasein verdaut. Dieses Verfahren findet heute auch noch in der pharmazeutischen Industrie Anwendung. Die Methode wurde in neuerer Zeit häufig modifiziert (9, 10). Oft Erwähnung findet auch die Methode von J. BAUMANN (11), bei welcher die Grenzverdünnung bestimmt wird, durch welche eine 0,01 %ige Kaseinlösung in 30 Minuten so abgebaut wird, daß mit Sulfosalizylsäure keine Fällung mehr eintritt.

Die Abnahme der Substratkonzentration durch fermentative Proteolyse wird bei den bisher beschriebenen Methoden durch Vergleich mit einer Standardlösung festgestellt. Dabei können durch die Subjektivität der Beobachter die Fehlerquellen recht erheblich sein. Die von P. RONA und H. KLEINMANN (12) entwickelte Bestimmungsmethode vermindert diese Fehlerquellen. Es wird die Menge des ungespalten vorhandenen Substrates (Kasein) durch Herstellung einer haltbaren homogenen Trübung mittels Chinidin nephelometrisch erfaßt; daraus kann die Menge des verdauten Substrates errechnet und somit auch ein Maßstab für die fermentative Proteolyse gefunden werden. B. J. KRIJGSMANN (13) gestaltete die Methode zu einer Mikroanordnung um. Als Substrat finden bei diesen beiden Verfahren neben Kasein auch Serum, Serumalbumine, Gelatine, Organproteine und Edestin Verwendung.

Bei der enzymatischen Proteolyse werden durch die Aufspaltung der Säureamidbindungen stets äquivalente Mengen Carboxyl- und Aminogruppen frei. Auf dieser Tatsache beruhen die rein chemischen Bestimmungen. Es werden die sauren bzw. basischen Gruppen durch Titration mengenmäßig genau erfaßt. Der Gesamt- ablauf des proteolytischen Geschehens wird damit einer Beobachtung zugänglich.

Die Bestimmung der Carboxylgruppen wird nach der von F. W. FOREMANN (14) angegebenen und von R. WILLSTÄTTER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ (15, 16) speziell für die Pankreasproteasen ausgearbeiteten Methode durchgeführt. Als Substrat eignet sich am besten Kasein. Nach Aktivierung der Fermentlösung mit Enterokinase wird die Proteolyse unter einheitlichen Bedingungen in einer festgelegten Zeit durchgeführt. Nach Unterbrechung der Proteolyse und Zusatz eines Indikators mit Umschlagspunkt im alkalischen Gebiet werden in alkoholischer Lösung die Carboxylgruppen mit Kalilauge titriert. Die Dissoziation der gleichzeitig anwesenden Aminogruppen wird durch die alkoholische Lösung so zurück-

gedrängt, daß ein Umschlag des Indikators ins Alkalische durch sie nicht mehr möglich ist. In einem Blindversuch wird diejenige Menge Alkali ermittelt, die sich im genauen analytischen Vergleich ohne fermentative Proteolyse ergibt. Eine Trypsineinheit, gemessen mit Kasein, ist diejenige Enzymmenge, die unter den gegebenen Bedingungen eine Spaltung entsprechend 1,05 ccm 0,2 n-KOH bewirkt.

Die WILLSTÄTTER Methode ist für die Untersuchung von Pankreaspräparaten wohl die am häufigsten angewandte Methode. In modifizierter Form fand sie auch Anwendung unter fünffacher Vergrößerung des Ansatzes bzw. zweifacher Vergrößerung der Titrationsprobe (17).

E. BAMANN und K. MYRBÄCK (18) bemerken zur WILLSTÄTTER-Methode, daß die Titrationsausschläge bei der Carboxylgruppenbestimmung sehr gering sind.

Die WILLSTÄTTER-Methode ist nach K. WALLENFELS (19) zur proteolytischen Aktivitätsbestimmung nicht sehr geeignet, da sie keine Differenzierung zwischen den verschiedenen Stufen des komplexen Vorganges der Proteolyse erlaube. Er schlägt zur Proteasebestimmung die von T. WINNICK, A.R. DAVIS und D.M. GREENBERG (20) ausgearbeiteten Stickstoffbestimmungen des nicht verdauten Resteiweißes vor.

Dagegen sind E. BALZER und K. WERNER (21) der Ansicht, daß es sich bei der Titration der bei der Proteolyse freiwerdenden Carboxyl- bzw. Aminogruppen um eine Erfassung der gesamten proteolytischen Aktivität handelt. Ihrer Ansicht nach wird bei der Stickstoff-Bestimmung nach T. WINNICK, A.R. DAVIS und D.M. GREENBERG (20) nur ein Ausschnitt der Proteolyse, und zwar die erste Phase, gemessen; im Vergleich der einzelnen Präparate untereinander sollen auch bei Anwendung verschiedener Methoden die Relationen die gleichen bleiben.

Neben der Modifikation der WILLSTÄTTER-Methode von H. LEUBNER (22) verdient die Modifikation von W. PREIBISCH, zit. n. VINAZZER (23) deshalb besonderes Interesse, weil hier als Substrat Gelatine verwendet wird. Die Titration erfolgt mit Natronlauge. Als Trypsineinheit wird die Fermentmenge bezeichnet, die aus Gelatine unter gegebenen Bedingungen Aminosäuren abspaltet, zu deren Neutralisierung 1 ccm 0,1 n-NaOH benötigt wird.

Der gleiche Effekt, der bei der Titration der Carboxylgruppen nach WILLSTÄTTER durch Alkoholzusatz erzielt wird, erreicht S.P.L. SÖRENSEN (24) durch Zusatz von Formaldehyd: die basischen Eigenschaften der Aminosäuren und Peptide werden zurückgedrängt und damit die sauren Gruppen der alkalimetrischen

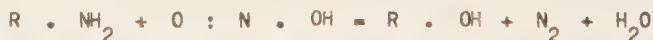
Bestimmung zugänglich gemacht.

Die englische Pharmacopoe 1953 bestimmt die Verdauungskraft der Pankreasenzyme durch Formoltitration der freigesetzten Carboxylgruppen nach SÖRENSEN. Als Substrat findet eine Kaseinlösung Verwendung.

Die Bestimmung der bei der Proteolyse freigelegten Aminogruppen kann nach dem Verfahren von K. LINDERSTRÖM-LANG (25) erfolgen. Zur Erniedrigung der Dissoziationskonstante und damit zur Verminderung der Ionisation der Aminosäuren wird als Lösungsmittel bei der Titration Azeton verwandt. Die Titration selbst erfolgt mit alkoholischer Salzsäure unter Zusatz von Naphthylrot als Indikator.

Erwähnt sei noch die Titration der Aminogruppen mit Perchlorsäure in Eisessig nach HARRIS in der Ausarbeitung von G.F. NADEAU und L.E. BRANCHEN (26).

Die Erfassung der freien Aminogruppen kann neben der rein chemischen Methode auch auf chemisch-physikalischem Wege erfolgen. Die Bestimmung nach D.D. van SLYKE (27) beruht auf der Reaktion der primären aliphatischen Aminogruppen mit salpetriger Säure:



Die Menge des gebildeten Stickstoffes wird volumetrisch gemessen, nachdem gleichzeitig entstandene Stickoxyde mit alkalischer Permanganatlösung absorbiert wurden.

Waren die von D.D. van SLYKE (27) entwickelten Methoden noch an entsprechend gebaute Apparate gebunden, so ergaben die Arbeiten von O. WARBURG, W. CHRISTIAN und A. GRIESE (28) die Möglichkeit, die Bestimmungen auch in der gewöhnlichen manometrischen Versuchsanordnung von WARBURG durchzuführen.

Ein in letzter Zeit immer häufiger verwandtes Verfahren zur Messung der proteolytischen Aktivität von Enzympräparaten ist der Proteinasetest von M.L. ANSON (29). Hier wird als Substrat für die fermentative Verdauung denaturiertes Hämoglobin verwendet. Das unverdaute Hämoglobin wird mit Trichloressigsäure ausgefällt. Die Menge der mit Trichloressigsäure nicht ausfällbaren Eiweißprodukte dient als Maßstab der wirksamen Proteasen. Diese werden mit dem Phenolreagens nach O. FOLIN und V. CIOCALTEU (30) (Blaufärbung mit Tyrosin und Tryptophan) kolorimetrisch gemessen. Zum Vergleich dient eine definierte Tyrosinlösung. Als eine Fermenteinheit wird diejenige Enzymmenge bezeichnet, die unter gegebenen Bedingungen in der Anfangsphase der Verdauung soviel färbbare Eiweißspaltprodukte freisetzt, als der Farbreaktion von einem

Milliäquivalent Tyrosin entsprechen.

Unter besonders günstigen Versuchsbedingungen kann die proteolytische Wirkung der Endopeptidasen (Trypsin, Chymotrypsin) getrennt erfaßt werden. Diese Bedingungen sind bei möglichst kurzer Einwirkungszeit (10 Min.) von Enzym auf Substrat gegeben; gleichzeitig ist hierbei die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymkonzentration proportional. Von M.L. ANSON (29) ist diese Proportionalität an kristallisiertem Pepsin und Trypsin nachgewiesen worden. Sie besteht auch für kommerzielle Präparate (31).

Bei der Bestimmung der Phenolgruppen mit dem ANSON-Verfahren wird neben Tyrosin noch Tryptophan mitbestimmt. Deshalb schlägt I.N. HUNT (32) an Stelle von Tyrosinstandardlösungen eine Phenollösung zur Herstellung der Eichkurve vor und gibt die Spaltung dementsprechend in Phenolwerten an.

Die ANSON-Methode ist von H. BERGSTERMANN (33) etwas modifiziert worden. Als Proteaseeinheit wird dabei diejenige Enzymmenge gewählt, die eine 1,5 %ige Hämoglobinlösung unter Standardbedingungen mit einer solchen Anfangsgeschwindigkeit abbaut, daß die pro Minute gebildeten trichloressigsäurelöslichen Spaltprodukte dieselbe UV-Absorptionszunahme bei 280 m μ aufweisen wie 10 γ Tyrosin.

K. WALLENFELS (34) stellt zur Aktivitätsbestimmung von proteolytischen Fermenten mit Hilfe des ANSON-Testes fest, daß mit dieser Bestimmung nur eine sehr spezielle Seite des proteolytischen Abbaues gemessen wird, nämlich der Gehalt an Tyrosin und Tryptophan in reaktionsfähiger Form im Trichloressigsäurefiltrat. Dabei wird von K. WALLENFELS besonders hervorgehoben, daß Tyrosin und Tryptophan im allgemeinen bevorzugt vor anderen Aminosäuren aus dem Proteinverband gelöst werden. Der Wert eines Präparates, welches die natürlichen Verdauungsenzyme substituieren muß, sollte deshalb keinesfalls nach einer Methode bestimmt werden, welche auf einer Einzelercheinung der Proteolyse, wie z.B. der Freilegung einer bestimmten Aminosäure aus dem Proteinverband, beruht. Hier sollte vielmehr eine Methode angewendet werden, welche in höherem Maße die Gesamtproteolyse erfaßt.

Eine weitere kolorimetrische Methode, die das gesamte proteolytische Geschehen zu verfolgen erlaubt, stammt von R.M. TOMARELLI, J. CHARNEY und M.L. HARDING (35). Hier wird ein Azoprotein der Verdauung unterworfen. Es entstehen dabei gefärbte Spaltprodukte, die in Trichloressigsäure löslich sind. Die Farbintensität der Trichloressigsäurefiltrate ist eine Funktion der proteolytischen Aktivität der Enzymlösung.

Eine photometrische Bestimmung nach der Ninhydrinmethode wurde von G.W.

SCHWERT (36) in neuester Zeit entwickelt. Untersuchungen über den Fermentgehalt von Handelspräparaten an Hand dieser Methode liegen noch nicht vor.

Ein interessanter Versuch der quantitativen Trypsinbestimmung ist die von E. SPEYER (37) ausgearbeitete Agar-Diffusionsmethode. Die auf einer Agarplatte mit Kaseinzusatz entstehende Fermentdiffusionszone wird mit einem Fällungsmittel sichtbar gemacht. Der Durchmesser des Kaseinauflösungsfeldes dient als Maß für die Fermentkonzentration.

J. ABELIN und H. PFISTER (38) bestimmen proteolytische Fermente mit Hilfe von Invertseifen. Da nur natives Eiweiß von Invertseifen zur Fällung gebracht wird, kann eine Lösung mit bekanntem Eiweißgehalt vor und nach der Verdauung mit Seifenlösung titriert werden.

Ein Maß für die Wirksamkeit von Proteasen ist auch der in der Zeiteinheit freigesetzte säurelösliche Stickstoff, der nach KJELDAHL bestimmt werden kann.

Bisherige Ergebnisse:

In den vergangenen Jahren fanden verschiedentlich vergleichende Aktivitätsbestimmungen von Pankreaspräparaten statt. So untersuchte H. VINAZZER (23) die tryptische Aktivität von sieben verschiedenen Handelspräparaten. Er arbeitete nach der Methode von R. WILLSTÄTTER, modifiziert von W. PREIBISCH zit.n. VINAZZER (23). Die stärkste proteolytische Aktivität zeigten dabei die Präparate Festal, Pankreon und Pankrodigest. Es fanden sich beträchtliche Aktivitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Präparaten. H. VINAZZER schloß daraus, daß die untersuchten Präparate auch bei ihrer klinischen Anwendung verschieden wirksam sein müßten.

Ebenfalls an Hand der WILLSTÄTTER-Methode untersuchten E. BALZER und K. WERNER (39) den Proteasengehalt (pH 7,5) von im Handel befindlichen Pankreaspräparaten. Sie fanden für Combizym, Pankreon, Festal, Pankrazym N und Okipan eine sehr hohe proteolytische Wirksamkeit. Bei Dymal und Arbuz waren tryptisch wirksame Proteasen (pH 7,5) nur noch in ganz geringem Ausmaß, zum Teil nur in Spuren, nachweisbar. Die Vergleichsuntersuchungen ergaben also auch hier beträchtliche Unterschiede in der Fermentaktivität der verschiedenen Präparate. Nach Angabe dieser Autoren konnten diese Untersuchungsergebnisse auch klinisch bestätigt werden.

H. BERGSTERMANN (33) untersuchte eine große Anzahl von Präparaten sowohl nach der WILLSTÄTTER-Methode als auch nach der modifizierten ANSON-Methode (Absorp-

tionszunahme in Trichloressigsäurefiltrat bei 280 m μ). Nach beiden Methoden zeigten Pankrazym N und Pankreon eine hohe Wirksamkeit. Nach der ANSON-Methode erwiesen sich das Schimmelpilzpräparat Okizym und das Papain-Präparat Arbuz als besonders wirksam.

III. Eigene Untersuchungen

Das Ziel unserer eigenen Untersuchungen war zunächst die Prüfung der Methoden verschiedener Pharmakopoen (Ergänzungsbuch zum DAB 6, Pharmacopoea Helvetica V) auf ihre Brauchbarkeit zur Testung von Pankreasferment-Präparaten. Da diese Bestimmungen sehr ungenaue Ergebnisse erbrachten, wählten wir aus der großen Anzahl der sonst beschriebenen Methoden die Carboxylgruppentitration nach R. WILLSTÄTTER, den Proteasetest nach M.L. ANSON und die Methode nach R.M. TOMARELLI, J. CHARNEY und M.L. HARDING zur Prüfung der proteolytischen Aktivität von Fermentpräparaten aus.

Wir untersuchten folgende im Handel befindliche Präparate:

Name des Präparates	Hersteller	Chargen-Nr.	Proteolytische Komponenten pro Tablette nach "Rote Liste 1957"
Arbuz	Dr. Schwab, München	234	akt. Papain, 0,043 g Pankreatin 0,016 g
Combizym	Luitpold-Werke München	2426	Proteasen, stand. nach WILLSTÄTTER
Digestomal	J. Moser, Nachf. Kirchzarten Breisgau	2	Verdauungsfermente
Dymal	C.F. Böhringer u. Söhne Mannheim	20064	Verdauungsfermente hergest. a. Reinkultur v. Schimmelpilzen (Aspergillus-Arten)
Enzym-Grandelat	Keimdiät, Augsburg	178	5000 μ Proteinasen
Enzymapain	Jura-K.G., Konstanz		pflanzliche Proteasen
Enzynorm	Nordmark, Hamburg	962	Magenenzympräparat
Enzypan	Norgine, Marburg		Pepsin (1:20000) 0,004 g; Trypsin 0,048 g

Name des Präparates	Hersteller	Chargen-Nr.	Proteolytische Komponenten pro Tablette nach "Rote Liste 1957"
Fermocyl	E. Rath, Frankfurt/M.		Pankreatin 2% Faex med. 88%.
Festal	Hoechst A.G. Frankfurt/M.	19363	15 Trypsineinheiten n. WILLSTÄTTER
Hevizym	Amol-Werke, Hamburg		Verdauungsfermente
Intestiflor	Henning Berlin-Hambg.		15000 Baumann-Einheiten, 4 Trypsineinheiten nach WILLSTÄTTER
Intestinol	Henning, Berlin-Hambg.		8 Trypsin-Einheiten nach WILLSTÄTTER
Kathepzym	Amol-Werke, Hamburg		9,8 mg Tyrosin nach ANSON (pH 4,2)
Luizym	Luitpold-Werke München	422	Verdauungsfermente stand. n. WILLSTÄTTER
Okipan	Röhm & Haas Darmstadt	50077	Extr.Pankreat.sicc. 0,05 g Extr.Mycel. asperg. 0,05 g Papain 0,05 g
Okizym	Röhm & Haas Darmstadt		Extr.Mycel.asperg. 0,06 g Papain 0,06 g
Pankrazym	Röhm & Haas Darmstadt	50046	Extr.Pankreat.sicc. 0,125 g Faex sicc. 0,1 g
Pancurmen	Temmeler-Werke Hamburg		Pancreas sicc. 0,25 g Curcumin Natr. 0,1 g
Pankreatin "Brunnengräber"	Brunnengräber Lübeck	E I 104	30 Trypsin-Einheiten nach WILLSTÄTTER
Pankreon	Kali-Chemie Hannover	956	28 Trypsin-Einheiten nach WILLSTÄTTER

Name des Präparates	Hersteller	Chargen-Nr.	Proteolytische Komponenten pro Tablette nach "Rote Liste 1957"
Pankrodigest	Sanabo Wien	550832	Trypsin standardisiert
Panpeptal	Brunnengräber Lübeck	422	11-12 DAB 6-Einheiten Pepsin, 8-10 Trypsin- Einheiten nach WILL- STÄTTER
Pantozym	Wander-A.G. Bern	14663	Verdauungsenzyme

Als Vergleichssubstanzen fanden Verwendung:

Name des Präparates	Hersteller	Chargen-Nr.	Proteolytische Komponenten pro Tablette nach "Rote Liste 1957"
Trypsin	Merck A.G. Darmstadt	52735	mindestens 40000 FULD- GROSS-Einheiten pro g
Pankreat. absolut.	Merck A.G. Darmstadt		F.U.VI, Pharmacopoea Belg.IV, Brit. 1932, Helv. V, Hung. IV, Mex. 1930, Port.1936, USP XIV

Ergebnisse:

1. Verfahren nach dem Ergänzungsbuch zum DAB 6

Die Beurteilung der Präparate erfolgte nach dem Grad der Milchkoagulation durch Salpetersäure nach Verdauung des Substrates durch die Fermentlösung in einer Stunde. Die geringste Ausflockung der Milch, also die beste Wirksamkeit, zeigten dabei folgende Präparate: Combizym, Enzypan, Festal, Pankreon und Pankreatin. Quantitative Werte über die Wirksamkeit der einzelnen Präparate konnten jedoch mit dieser Methode nicht gewonnen werden. Um etwas genauere Aussagen über den Fermentgehalt der Pankreaspräparate machen zu können, haben wir den nach einer Stunde sich absetzenden Bodensatz geschätzt. Auch hier zeigten Combizym, Enzypan, Festal, Pankreon und Pankreatin die besten Verdauungswerte.

2. Methode nach der Pharmacopoea Helvetica (Editio Quinta)

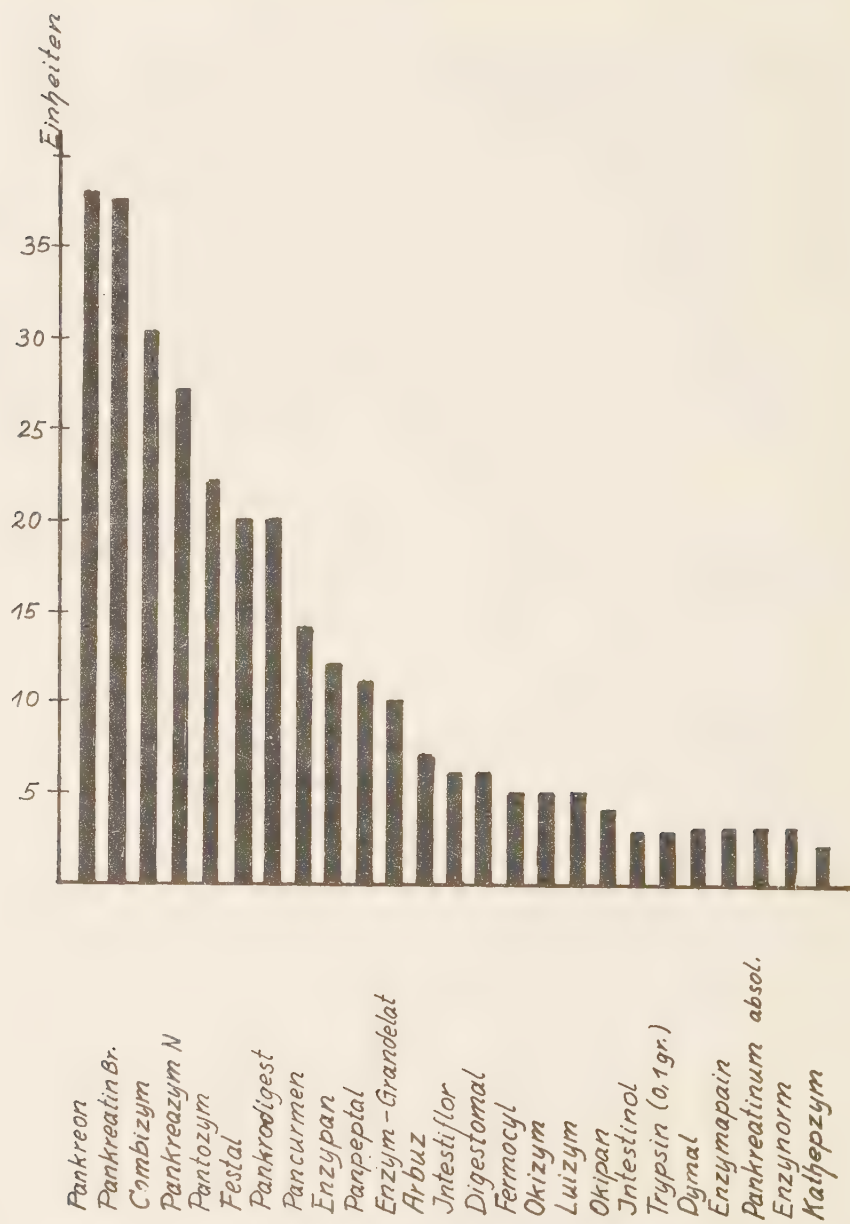
Die untersuchten Pankreaspräparate entsprachen nicht den Forderungen der Pharmacopoea Helvetica. Sie zeigten bei der Ausfällung des nicht verdauten Substrates mit dem vorgeschriebenen Eiweiß-Fällungsmittel durchweg eine stärkere Trübung als die Vergleichslösung.

Um dennoch bestimmen zu können, wieviel Prozent der vorgelegten Substratlösung durch die einzelnen Präparate abgebaut wurde, stellten wir in Anlehnung an die Untersuchungen von W. HORSCH und K. KÖNIG (10) mehrere Vergleichstrübungen mit bekanntem Substratgehalt her. Aus dem Vergleich der Trübungen von Verdauungsansätzen und Vergleichslösungen konnte der Gehalt an noch nicht verdautem Eiweiß und somit die proteolytische Wertigkeit der Präparate untereinander wie folgt festgelegt werden:

Pankreon	verdaut 92% der vorgelegten Kaseinlösung				
Combizym	"	88%	"	"	"
Festal	"	88%	"	"	"
Pankreatin Br.	"	86%	"	"	"
Enzypan	"	76%	"	"	"

3. Methode nach WILLSTÄTTER

Wir führten unsere Untersuchungen in Anlehnung an die Kasein-Methode von R. WILLSTÄTTER, E. WALDSCHMIDT-LEITZ, S. DUNAITURRIA und G. KÜNSTNER (16) in der schon oben erwähnten Modifikation durch; dabei arbeiteten wir mit der fünffachen Vergrößerung des Verdauungsansatzes bzw. mit zweifacher Vergrößerung der Titrationsprobe. Wir bestimmten im gleichen Ansatz sowohl Leerwert als auch Reaktionswert. Zu den Untersuchungen wurden mindestens drei verschiedene Tablettenansätze verwendet und daraus die Mittelwerte errechnet. Die Angaben der Fermentleistung erfolgen in WILLSTÄTTER-Einheiten pro Tablette.



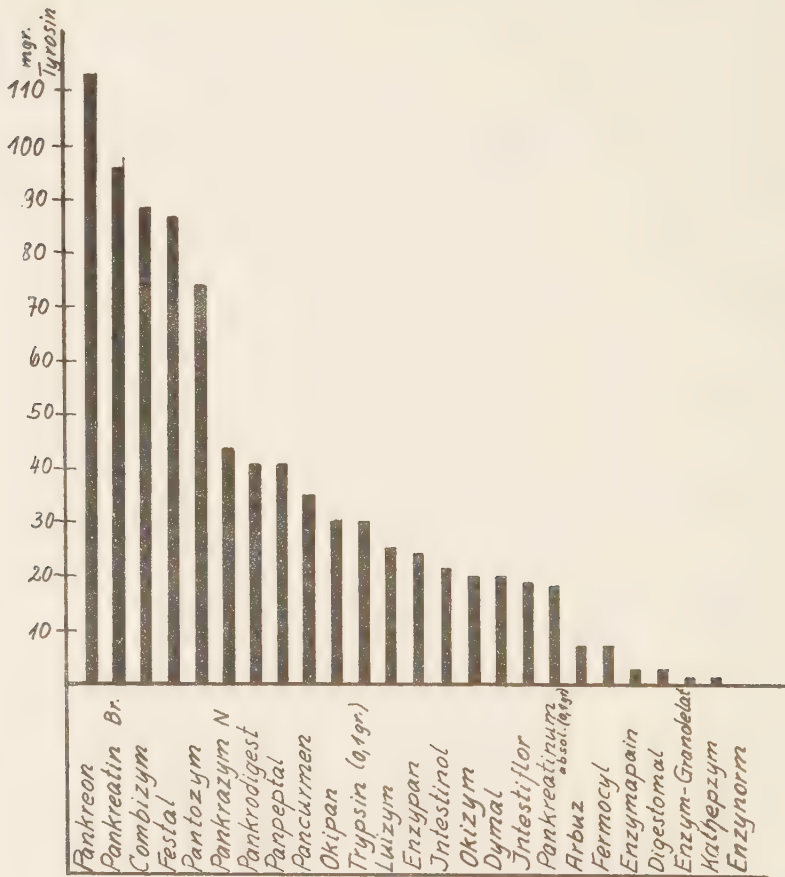
Ergebnisse nach der Methode von Willstätter

Tabelle 1

Pankreon	38,00	WILLSTÄTTER-Einheiten/Tablette		
Pankreatin				
"Brunnengräber"	37,50	"	"	"
Combizym	30,25	"	"	"
Pankrazym N	27,00	"	"	"
Pantozym	22,50	"	"	"
Festal	20,25	"	"	"
Pankrodigest	20,20	"	"	"
Pancurmen	14,25	"	"	"
Enzypan	12,25	"	"	"
Panpeptal	11,20	"	"	"
Enzymgrandelat	10,50	"	"	"
Arbuz	7,45	"	"	"
Intestiflor	6,75	"	"	"
Digestomal	6,75	WILLSTÄTTER-Einheiten/5 ml		
Fermocyl	5,50	WILLSTÄTTER-Einheiten/Tablette		
Okizym	5,25	"	"	"
Luizym	5,25	"	"	"
Intestinol	4,50	"	"	"
Okipan	3,75	"	"	"
Trypsin	3,75	WILLSTÄTTER-Einheiten/0,1 g		
Dymal	3,00	WILLSTÄTTER-Einheiten/Tablette		
Enzymapain	3,00	"	"	"
Pankreatinum absolutum	3,00	WILLSTÄTTER-Einheiten/0,1 g		
Enzynorm	3,00	WILLSTÄTTER-Einheiten/Tablette		
Kathepzym	2,00	"	"	"

4. Methode nach ANSON

Als Substrat fand bei diesen Untersuchungen mit Harnstoff denaturiertes Hämoglobin Verwendung. Die noch nicht abgebauten Eiweißkörper wurden mit Trichloressigsäure ausgefällt und Tyrosin und Tryptophan mit dem Phenolreagens kolorimetrisch bestimmt. Zum Vergleich diente eine definierte Tyrosinlösung. Es wurden mindestens fünf verschiedene Tablettenansätze untersucht und daraus die Mittelwerte errechnet. Die Verdauungskraft der einzelnen Präparate ist in mg Tyrosin pro Tablette angegeben.



Ergebnisse nach der Methode von Anson

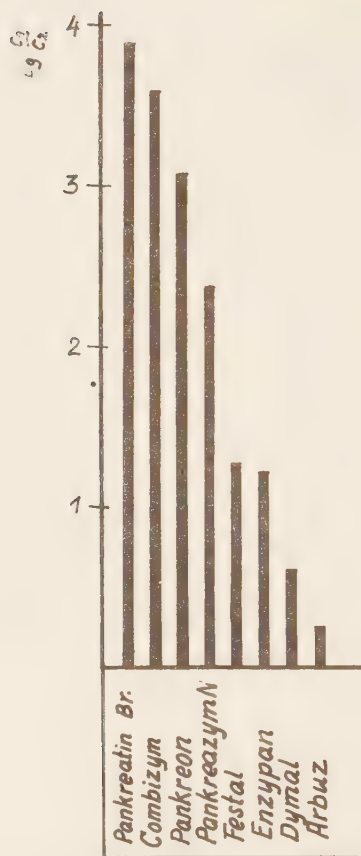
Tabelle 2

Präparat	Tyrosin-N	Tyrosin		
Pankreon	8438	109200	pro	Tablette
Pankreatin				
"Brunnengräber"	7422	96050	"	"
Combizym	6875	88972	"	"
Festal	6797	87967	"	"
Pantozym	5781	74817	"	"
Pankrazym N	3437	44497	"	"
Pankrodigest	3281	42460	"	"

Präparat	Tyrosin-N	Tyrosin
Panpeptal	3279	42451 pro Tablette
Pancurmen	2747	35550 " "
Okipan	2344	30335 " "
Trypsin	2334	30321 " 0,1 g
Luizym	1953	25276 " Tablette
Enzypan	1875	24265 " "
Intestinol	1641	21233 " "
Okizym	1563	20227 " "
Dymal	1560	20216 " "
Intestiflor	1484	19200 " "
Pankreatinum absolut.	1406	18194 " 0,1 g
Arbuz	547	7079 " Tablette
Fermocyl	543	7062 " "
Enzymapain	156	2019 " "
Digestomal	150	2012 " 5 ml
Enzymgrandelat	78	1010 " Tablette
Kathepzym	78	1010 " "
Enzynorm	--	--

5. Methode nach TOMARELLI-CHARNEY-HARDING

An Hand einiger Präparate wurde die von R.M. TOMARELLI, J. CHARNEY und M.L. HARDING (35) ausgearbeitete Methode auf ihre Brauchbarkeit zur Testung von proteolytisch wirksamen Substanzen geprüft. Ein diazotiertes Protein liefert nach Verdauung bei optimalen Bedingungen gefärbte Spaltprodukte. Diese sind im Trichloressigsäurefiltrat photometrisch erfaßbar; es kann daraus ein Rückschluß auf die Verdauungskraft der Präparate gezogen werden. Im folgenden sind die Ergebnisse wiedergegeben. Die Angaben erfolgen dabei pro Tablette der untersuchten Präparate:



Ergebnisse nach der Methode von Tomarelli-Charney-Harding

Tabelle 3

Präparat	$\log \frac{C_1}{C_2}$	pro Tablette
Pankreatin "Brunnengräber"		3,8595
Combizym		3,5675
Pankreon		3,0680
Pankrazym N		2,3695
Festal		1,4405
Enzypan		1,3625
Dymal		0,6100
Arbuz		0,2510

IV. Experimenteller Teil

1. Verfahren nach dem Ergänzungsbuch des DAB 6

200 ml frische Kuhmilch werden auf 38° C erwärmt und mit einer ebenfalls auf 38° C erwärmten Anreibung von 0,15 g Pankreatin, 0,75 g Natriumcarbonat und 50 ml Aq. dest. vermischt. Diese Mischung läßt man bei der Temperatur von 38 - 40° C eine Stunde lang unter öfterem Umschütteln stehen. Nunmehr darf eine Probe (10 ml) der peptonisierten Milch auf Zusatz eines gleichen Volumens Salpetersäure nicht mehr koaguliert werden. Die Stärke der auftretenden Koagulation bei den einzelnen Präparaten wird geschätzt. Bei der Messung der Bodenrückstände im Standzylinder nach einer Stunde ergaben sich folgende Werte:

Pankreon	2,0 cm
Festal	2,0 cm
Combizym	2,4 cm
Fermocyl	8,4 cm
Gesamtsäule	10,0 cm

2. Methode nach der Pharmacopoea Helvetica (Editio Quinta)

Zur Prüfung der proteolytischen Wirksamkeit von Pankreasferment-Präparaten benützten wir nach den Vorschriften eine Kaseinlösung, eine Kaseinvergleichslösung und eine Fermentaufschwemmung, welche in folgender Weise hergestellt wurden:

Kaseinlösung: 0,1 g Kasein wird in ein trockenes Meßkölbchen von 50 ml Inhalt gegeben und durch Schütteln mit wenig Aq. dest. aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung wird mit 30 ml Aq. dest. verdünnt und unter Umschwenken mit 1 ml 0,1 n-NaOH versetzt. Das Kasein wird unter Erwärmen auf 40° C durch Umschwenken, unter Vermeidung von Schütteln, gelöst. Die Lösung verdünnt man nach dem Abkühlen auf gewöhnliche Temperatur mit Aq. dest. auf 50 ml.

Kaseinvergleichslösung: 2,5 ml der obigen Kaseinlösung werden in einem Meßkölbchen von 100 ml Inhalt mit 50 ml Aq. dest. verdünnt, mit 1 ml 0,1 n-NaOH versetzt und mit Aq. dest. auf 100 ml ergänzt.

Fermentaufschwemmung: 1 Tablette wird mit Seesand zerrieben und mit wenig Aq. dest. in einem Schälchen angerührt. Die Mischung wird mit Aq. dest. ver-

lustlos in einen Meßkolben von 500 ml Inhalt gespült, mit Aq. dest. auf 500 ml ergänzt und eine halbe Stunde bei $37,5^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad aktiviert.

Wertbestimmung: In einem dickwandigen Reagenzglas von ca. 13 mm innerer Weite mit Glasstopfen mischt man 5 ml der Kaseinlösung mit 3 ml Aq. dest. und 2 ml der unmittelbar vor der Probeentnahme gut gemischten Fermentlösung. Das Gemisch stellt man sogleich in ein konstantes Wasserbad von $37,5^{\circ}\text{C}$ und beläßt es dort während einer Stunde. Nach dieser Zeit wird die Verdauung durch Zugabe von 3 Tropfen einer Mischung gleicher Volumina verdünnter Essigsäure und Weingeist unterbrochen. Gleichzeitig mischt man in einem zweiten gleichweiten Reagenzglas 10 ml Kasein-Vergleichslösung mit 3 Tropfen der obigen Essigsäure-Weingeist-Mischung (Vergleichstrübung). Das Reagenzglas mit der verdauten Kaseinlösung wird nun ca. 4 Minuten lang in Wasser von gewöhnlicher Temperatur eingestellt. Vergleicht man dann binnen 3 Minuten die beiden Reagenzgläser, so darf die Trübung der verdauten Probe höchstens gleich stark sein wie diejenige der Vergleichstrübung. Die verschieden eingestellten Kasein-Vergleichslösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

Kaseinstammlösung: 0,2 g Kasein werden in einem Meßkölbchen von 100 ml Inhalt mit wenig Aq. dest. geschüttelt; nach Zugabe von 50 ml Aq. dest. werden 2 ml 0,1 n-NaOH zugesetzt und das Kasein durch Erwärmen auf 40°C unter vorsichtigem Umschwenken gelöst. Nach Lösung des Kaseins und Abkühlung auf Zimmertemperatur wird auf 100 ml mit Aq. dest. aufgefüllt. Jeder Verdauungsansatz enthält 5 ml dieser Lösung (= 10 mg Kasein); diese Menge wird gleich 100% Substrat gesetzt.

Kaseinvergleichslösung 8%: 4 ml der Kaseinstammlösung werden in einem Meßkölbchen von 100 ml Inhalt mit 50 ml Aq. dest. verdünnt, mit 1,6 ml 0,1 n-NaOH versetzt und mit Aq. dest. auf 100 ml ergänzt. 10 ml dieser Vergleichslösung enthalten 0,8 mg Kasein; eine dieser Konzentration entsprechende Trübung des ursprünglich 5 ml (= 10 mg Kasein) enthaltenden Verdauungsansatzes entspricht demnach 0,8 mg = 8% nicht abgebautem Kasein.

Kaseinvergleichslösung 12%: 6 ml der Kaseinstammlösung werden entsprechend, wie unter Kaseinvergleichslösung 8% beschrieben, gelöst. Die weiteren Vergleichslösungen (16%, 20%, 24%, 28% etc.) werden sinngemäß nach der angegebenen Vorschrift hergestellt. Als Substrat fand bei allen Versuchen Kasein nach Hamarsten der Firma E. Merck, Darmstadt Verwendung. Die zwischen den einzelnen Vergleichslösungen liegenden Werte wurden geschätzt. Für jedes Präparat wurden mindestens 4 Verdauungsansätze durchgeführt.

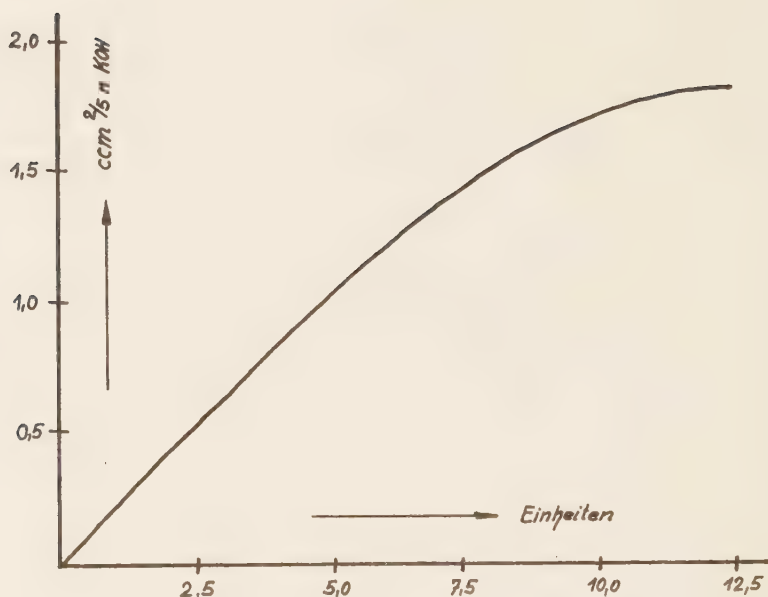
3. Methode nach WILLSTÄTTER

Fermentlösung: 2 Tabletten werden mit Seesand im Mörser fein zerrieben und mit 2 ml Glycerin über Nacht angeteigt.

Kaseinlösung: 15 g Kasein teigt man mit ungefähr 150 ml Aq. dest. im Mörser an, gibt dann 15 ml $n/1\text{-NH}_3$ dazu und füllt mit Aq. dest. auf 250 ml auf.

Pufferlösung: $n\text{-NH}_3$ und $n\text{-NH}_4\text{Cl}$ werden im Verhältnis 1 : 2 gemischt. Der pH-Wert beträgt 8,3.

Wertbestimmung: Die angeteigten Tabletten werden mit Aq. dest. zu 30 ml suspendiert. 5 ml (= 1/3 Tablette) werden in eine Weithalsflasche pipettiert und dazu 10 ml Aq. dest. gegeben. Das Gemisch wird zur Aktivierung 30 Minuten im Thermostaten bei $37,5^\circ\text{C}$ belassen. Danach kommen 25 ml Kaseinlösung und 10 ml Puffer (beide Lösungen ebenfalls auf $37,5^\circ\text{C}$ vorgewärmt) dazu. Von dem Gemisch werden sofort 20 ml mit 2/5 normaler alkalischer Kalilauge unter Zusatz von 2 ml einer 1%igen Thymolphthaleinlösung bis zum ersten Farbumschlag titriert. Darauf fügt man 100 ml siedenden Alkohol hinzu, titriert abermals bis zum Farbumschlag; nach weiterem Zusatz von 50 ml Alkohol titriert man zu Ende (Anfangswert). Die im Reaktionsgefäß verbleibende Flüssigkeitsmenge von 30 ml wird 20 Minuten bei $37,5^\circ\text{C}$ belassen. Nach Ablauf dieser Zeit werden wiederum 20 ml entnommen und wie oben unter Zusatz von siedendem Alkohol titriert (Endwert). Aus der Differenz von Anfangs- und Endwert wird der Fermentgehalt mittels einer Eichkurve bestimmt. Gefundene Trypsineinheiten mal drei ergeben die Trypsineinheiten in einer Tablette.



Eichkurve für die Methode nach Willstätter

4. Methode nach ANSON

Als Substrat verwendeten wir das von den Behring-Werken hergestellte Trocken-hämoglobin (Feuchtigkeitsgehalt 3 - 5%, Globin- = Proteinanteil 96%).

Herstellung der Substratlösung: 5 ml einer n-NaOH, ca. 50 ml Aq. dest., 30 g Harnstoff und 10 ml einer 20%igen Hämoglobinlösung werden 30 Minuten zur Denaturierung bei 25° C belassen und dann nach Zugabe von 6,5 ml einer normalen KH_2PO_4 -Lösung auf 100 ml mit Aq. dest. aufgefüllt. Der Proteingehalt der Lösung ist 2%, der pH-Wert ist 7,5.

Herstellung der Fermentlösung: 1 Tablette wird mit Seesand im Mörser fein zerrieben und in 50 ml Aq. dest. gelöst. Zur Aktivierung wird die Lösung eine halbe Stunde bei 37,5° C belassen.

Fermentwirkung: 1 ml (0,5 ml Fermentlösung + 0,5 ml Aq. dest.) der verschie-

denen Fermentlösungen wird im Thermostat bei $37,5^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt. Sodann werden 5 ml vorgewärmtes Substrat mit einer Vollpipette im Abstand von 30 Sekunden in die verschiedenen Fermentlösungen einpipettiert und nach kräftigem Durchmischen 10 Minuten im Thermostat bei $37,5^{\circ}\text{C}$ gehalten. In entsprechender Reihenfolge wird nach 10 Minuten im Abstand von 30 Sekunden die Fermentwirkung durch Zugabe von 10 ml 0,3 n-Trichloressigsäure unterbrochen. Nach einer halben Stunde wird das ausgefallene (= nicht verdaute) Hämoglobin abfiltriert (Schleicher & Schüll, 1938). Vom Filtrat werden 5 ml in einen 50 ml Erlenmeyer-Kolben pipettiert und 10 ml einer 0,5 n-NaOH hinzugegeben.

Herstellung des Phenolreagens: 100 g Natriumwolframat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und 25 g Natriummolybdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) werden zusammen mit 700 ml Aq. dest. in eine Schliffkolbenflasche gebracht. Sodann fügt man 50 ml 85%ige Phosphorsäure und 100 ml konz. Salzsäure hinzu und hält das Gemisch nach Aufsetzen eines Rückflußkühlers 10 Stunden bei gelindem Sieden. Danach gibt man 150 g Lithiumsulfat, 50 ml Aq. dest. und einige Tropfen Bromwasser hinzu. Nun kocht man die Mischung erneut (ohne Rückflußkühler) zur Entfernung des überschüssigen Broms. Hierauf kühlt man ab, verdünnt auf 1 l und filtriert. Die Lösung muß eine goldgelbe Farbe haben; wenn sie einen grünlichen Farbton enthält, muß erneut mit 1 - 2 Tropfen Brom aufgekocht werden. Vor der Verwendung wird das Reagens mit der doppelten Menge Aq. dest. verdünnt.

Messung der Hämoglobinspaltung: Zur Erfassung der Hämoglobinspaltung ist die Messung folgender Werte erforderlich:

1. Substrat-Wasser-Leerwert (SWL): 5 ml Hämoglobinsubstratlösung und 1 ml Aq. dest., die mit 10 ml 0,3 n-Trichloressigsäure versetzt werden, sollen im Filtrat möglichst keine farbbildenden Substanzen enthalten; dies ist jedoch von der Art und dem Reinheitsgrad des verwendeten Hämoglobins abhängig.
2. Substrat-Enzym-Leerwert (SEL): Messung der farbbildenden Substanzen von 5 ml Hämoglobininlösung und 1 ml Enzymlösung, die sofort mit 10 ml 0,3 n-Trichloressigsäure versetzt werden, um jede Fermenteinwirkung zu vermeiden.
3. Verdauungswert (VW): Der Verdauungswert wird wie der SEL mit 5 ml Hämoglobininlösung und 1 ml Enzymlösung gewonnen; die Enteiweißung mit 10 ml 0,3 n-Trichloressigsäure wird aber erst nach der Fermenteinwirkung (10 Minuten) durchgeführt.

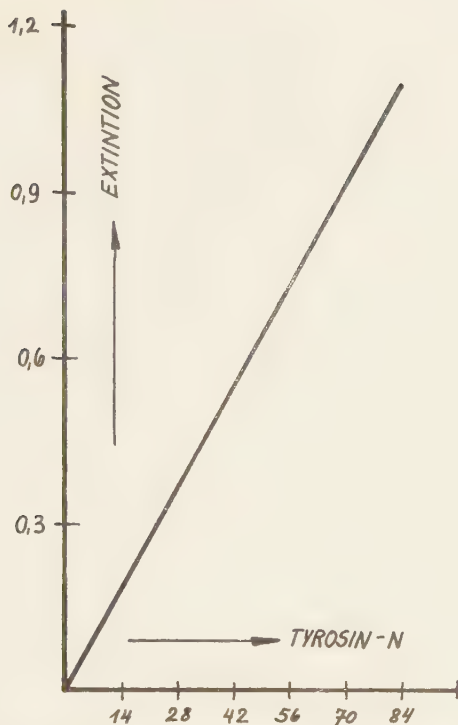
Die Farbmessung wird wie folgt ausgeführt: Zu 5 ml des entsprechenden Filtra-

tes (SWL-Filtrat, SEL-Filtrat, VW-Filtrat) und 10 ml 0,5 n-NaOH werden 3 ml Phenolreagens gleichmäßig tropfend und unter Umschütteln hinzugegeben. Die entsprechende Blaufärbung wird 3 - 12 Minuten nach Zugabe des Reagens kolorimetriert, da nur innerhalb dieser Zeitspanne eine konstante Farbtiefe entsteht.

Zur Messung verwendeten wir das Zeiß-Spektralphotometer PQM II. Es wurde bei einer Wellenlänge von 620 m μ und mit einer Schichtdicke von 1 cm in Glasküvetten gemessen. Die Eichkurve wird aus Verdünnungen einer m/1000-Tyrosinlösung (181 mg Tyrosin in 10 ml 1/10 n-HCl, mit 10 ml 1/10 n-NaOH neutralisiert und ad 1000 ml mit Aq. dest. aufgefüllt, Zusatz von 2 Tropfen Toluol) hergestellt. Diese Lösung enthält im ml 14 μ Tyrosin-N. Es werden folgende Verdünnungen hergestellt:

Verdünnung	1	2	3	4	5	6	7
m/1000-Tyrosinlösung in ml	0	1	2	3	4	5	6
Aqua dest. in ml	6	5	4	3	2	1	0
0,3 n-Trichlor-essigsäure in ml	10	10	10	10	10	10	10

Zu 5 ml jeder Verdünnung werden wie bei der sonstigen Farbbestimmung 10 ml 0,5 n-NaOH und 3 ml Phenolreagens zugefügt. Die erhaltenen Kurvenpunkte 1 - 7 entsprechen den Farbwerten für 0, 14, 28, 42, 56, 70 und 84 μ Tyrosin-N; diese Farbwerte ergeben eine Gerade, deren Steigungsfaktor man berechnen kann. Durch Division der erhaltenen Extinktionswerte mit dem Steigungsfaktor erhält man die dem Farbwert äquivalente Menge μ Tyrosin-N.



Eichkurve für die Methode nach Anson

5. Methode nach TOMARELLI-CHARNEY-HARDING

Substratherstellung: 0,025 Mole Sulfanilsäure werden in 200 ml Aq. dest. mit 0,025 Molen NaOH gelöst; dann werden 0,025 Mole NaNO_3 unter Rühren zugesetzt. Nach Zugabe von 0,025 Molen HCl wird noch 2 Minuten gerührt und die Lösung mit 0,05 Molen NaOH versetzt. Es wird noch 5 Sekunden gerührt, dann wird die Lösung auf einmal zu einer Lösung von 50 g Albumin und 10 g NaHCO_3 in 1,1 l Aq. dest. gegeben; es wird wieder 5 Minuten gerührt und über Nacht gegen Leitungswasser dialysiert. Die dialysierte Lösung wird gefroren und im Vakuum verdunstet. Zur Lyophilisation verwendeten wir das Texvac-Gerät Type V A der Firma Textor Bad Soden/Taunus.

Als Albumin fand bei unseren Untersuchungen das Albumin aus Eiern (Ergän-

zungsbuch 6, Riedel-de Haen A.G. Seelze bei Hannover) Verwendung. Das Azoalbumin ist eine rotorange Verbindung mit einem Absorptionsmaximum bei 510 - 520 m μ . Das von TOMARELLI dargestellte Azoalbumin zeigte ein Absorptionsmaximum zwischen 440 und 450 m μ . Die Konzentrationsabhängigkeit der Farbtintensität des Azoalbumins folgt dem Beer'schen Gesetz. Zu den Verdauungsversuchen wurde das Substrat in der Konzentration von 25 mg je ml Pufferlösung angewandt.

Herstellung der Fermentlösung: Eine Tablette wird im Mörser mit Seesand fein zerrieben und mit Bicarbonatpuffer vom pH 8,3 auf 50 ml verdünnt. Zur Aktivierung wird die Aufschwemmung eine halbe Stunde bei 37,5° C im Thermostaten belassen.

Wertbestimmung: Je 1 ml der Proteinlösung wird zu einem ml der Fermentlösung gegeben und das Gemisch bei 37,5° C bebrütet. Zur Bestimmung des Leerwertes wird an Stelle der Fermentlösung Pufferlösung zugesetzt. Nach 30 Minuten wird der Abbau durch Zugabe von 8 ml 5%iger Trichloressigsäure unterbrochen und der Inhalt eines jeden Reagenzglases durch Papier (Schleicher & Schüll, 598) filtriert. Von der Lösung werden 5 ml mit 5 ml 0,5 n-NaOH versetzt. Anschließend wird die Extinktion gemessen.

Die Geschwindigkeitskonstante (K) des Verdauungsvorganges ist ein Maß für die protoolytische Aktivität. Sie entspricht der Gleichung:

$$K = \frac{1}{t} \cdot 2,3 \lg \frac{C_1}{C_2}$$

C₁ und C₂ bedeuten Anfangs- und Endkonzentration des Proteins und können durch die Extinktionswerte ersetzt werden. C₁ wird ermittelt, indem man 5 ml 0,5 n-NaOH zu 5 ml der 200fach verdünnten Substratlösung hinzusetzt und die Extinktion bestimmt. Der C₂-Wert errechnet sich aus der Differenz zwischen C₁ und dem nach der Verdauung gefundenen Extinktionswert nach Abzug des Leerwertes.

V. Diskussion

Wie zu erwarten, ist die Methode des Ergänzungsbuches zum DAB 6 zur Testung von Fermentpräparaten vollkommen unzureichend. Durch sie können keinerlei Aussagen, weder über den Gehalt noch über die spezifische Wirksamkeit der zu prüfenden Substanzen, gewonnen werden.

Zu orientierenden Untersuchungen über den Fermentgehalt von Handelspräparaten läßt sich dagegen die Vorschrift der schweizerischen Pharmacopoe in der Modifikation von W. HORSCH und K. KÖNIG (10) heranziehen. Die Fehlergrenze der Methode kann durch die subjektive Bewertung der proteolytischen Leistung der einzelnen Präparate allerdings recht erheblich sein.

Eine quantitative Erfassung der Fermente bzw. deren Leistung kann mit den bei uns durchgeführten Methoden nur durch die Carboxylgruppentitration von WILLSTÄTTER, dem Protease-Test nach ANSON und der Methode nach TCMARELLI-CHARNEY-HARDING durchgeführt werden.

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß die einzelnen untersuchten Präparate bei diesen letzten drei Prüfungsmethoden im Vergleich miteinander in gewissen Schwankungsbreiten dieselben Wirkungswerte zeigen. Wir können somit die Ansicht von K. WALLÉN (19, 34), daß sowohl die Methode nach WILLSTÄTTER als auch der Protease-Test nach ANSON sich zu vergleichenden Untersuchungen von Fermentpräparaten nicht eignen würden, nicht bestätigen. Es werden zwar bei diesen beiden Methoden verschiedene Ausschnitte aus dem proteolytischen Geschehen erfaßt, bei vergleichenden Bestimmungen der proteolytischen Aktivität der Fermentpräparate sind aber die Relationen der einzelnen Präparate untereinander annähernd gleich. Die sich ergebenden geringgradigen Verschiebungen sind unserer Meinung auf folgende Ursachen zurückzuführen: Der Fermentgehalt der einzelnen Tabletten zeigt gewisse Schwankungsbreiten. Die Untersuchungen sollen deshalb immer mit einer gewissen Mindestmenge verschiedener Tablettenansätze durchgeführt werden. Die Lösung der Präparate erfolgt bei der WILLSTÄTTER-Methode über Nacht in Glycerin, während beim ANSON-Test die Lösung in Wasser durchgeführt wird. Aus diesen verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungszeiten ergeben sich, je nach Herstellungsart und Vorbehandlung des Fermentpräparates, recht unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich ihrer proteolytischen Leistung in vitro. Die Ausaktivierung der Fermentlösungen sollte bei den Versuchen stets erfolgen, um die Fehlerquellen durch die spontane Selbstaktivierung ausschließen zu können.

Beim ANSON-Test wird durch die kurze Verdauungszeit die Anfangsspaltung und damit die Endopeptidasenwirkung erfaßt. WILLSTÄTTER mißt in seiner Methode aber die gesamte Peptidspaltung; eine getrennte Erfassung der Endo- und Exopeptidasenwirkung kann hier kaum durchgeführt werden. Präparate, die nach der WILLSTÄTTER-Methode einen höheren Verdauungswert zeigen als im ANSON-Test, können diese unterschiedlichen Ergebnisse durch besonders hohen Gehalt an Exopeptidasen hervorrufen. Unter diesem Gesichtspunkt wäre den Ergebnissen nach der ANSON-Methode größere Bedeutung beizumessen.

Die Beobachtungen von E. BAMANN und K. MYRBÄCK (18), daß bei der Carboxylgruppenbestimmung nach WILLSTÄTTER recht geringe Titrationsausschläge beobachtet werden, können wir voll und ganz bestätigen. Allerdings wird bei der modifizierten Methode, nach der unsere Untersuchungen durchgeführt wurden, dieser Tatsache durch Erhöhung der Titrationsansätze Rechnung getragen. Genauere Ergebnisse in Form erhöhter Titrationsausschläge lassen sich aber dadurch nicht erreichen.

Die Farbstoffbildung beim ANSON-Test durch Zugabe des Phenolreagens unterliegt je nach Art der Zugabe gewissen Schwankungen. Es wäre deshalb zur Präzisierung der Ergebnisse die Anwendung der Modifikation von H. BERGSTERMANN (33) (Messung des Trichloressigsäurefiltrats bei 280 m μ ohne Phenolreagens) angebracht.

Die von H. BERGSTERMANN (33) beim ANSON-Test gefundene hohe Fermentwirkung der pflanzlichen Substitutionspräparate Arbus und Okizym konnte von uns nicht festgestellt werden. Die Untersuchung im alkalischen Milieu (pH 7,5 - 8,5) bietet für diese Gruppe von Enzymen (Papain, Hefe und Schimmelpilzprotease) keine optimalen Vorbedingungen für die Proteolyse. Diese Enzyme sollten deshalb in getrenntem Untersuchungsgang bei entsprechenden Versuchsbedingungen einer Testung unterzogen werden.

Die Methode nach TOMARELLI-CHARNEY-HARDING liefert beim Proteasetest gut reproduzierbare Werte und ist in ihrer Ausführung einfach und schnell. Sie kann zu Reihenuntersuchungen von proteolytischen Handelspräparaten deshalb besonders empfohlen werden, weil die Bildung der gefärbten Spaltprodukte direkt proportional dem Eiweißabbau erfolgt. So wird die gesamte eiweißverdauende Leistung der einzelnen Präparate sofort erfaßt, und die Fehlerquellen, die sich aus dem Nachweis spezifischer Abbauprodukte (z.B. Tyrosin und Tryptophan mit dem Phenolreagens) ergeben, werden dadurch ausgeschaltet. Gegenüber der Carboxylgruppentitration von WILLSTÄTTER bietet diese Methode den Vorteil größerer Empfindlichkeit. Bei standardisierter Herstellung des Substrates und bei guter Lös-

lichkeit desselben in den für die Testung der proteolytischen Aktivität wichtigsten pH-Bereichen könnte das Azoprotein generell als Vergleichssubstanz Verwendung finden.

VI. Zusammenfassung

1. Die kritische Wertung der Fachliteratur ergab, daß die verschiedenen Methoden zur Bestimmung der tryptischen Aktivität von Enzymgemischen in qualitativer und quantitativer Hinsicht meist unsichere und nicht vergleichbare Ergebnisse liefern. Es wurden deshalb eine Reihe von Methoden vergleichend auf ihre Brauchbarkeit zur Wertbestimmung proteolytischer Enzympräparate geprüft.
2. Im einzelnen wurden untersucht:
 - a) Methode des Ergänzungsbuches zum DAB 6
 - b) Methode nach der Pharmacopoea Helvetica (Editio Quinta)
 - c) Methode nach WILLSTÄTTER
 - d) Methode nach ANSON
 - e) Methode nach TOMARELLI-CHARNEY-HARDING
3. Die Methode des Ergänzungsbuches zum DAB 6 und die Methode nach der Pharmacopoea Helvetica (Editio Quinta) erwiesen sich zur Testung von Fermentpräparaten als unzureichend.
4. Bei den durchgeführten Reihenuntersuchungen der im Handel befindlichen Fermentpräparate erbrachten die Methode nach WILLSTÄTTER, der Protease-Test nach ANSON und die Methode nach TOMARELLI-CHARNEY-HARDING gut reproduzierbare Werte.
5. Bei der Methode nach WILLSTÄTTER, dem Protease-Test nach ANSON und der Methode nach TOMARELLI-CHARNEY-HARDING waren die Relationen der einzelnen Präparate untereinander annähernd gleich.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- (1) BERGMANN, M. and J. S. FRUTON J. biol. Chem. 117, 189 (1937)
- (2) FLASCHENTRÄGER, B. und E. LEHNARTZ "Physiologische Chemie" Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg Bd. I, 1156 bis 1158 (1951)
- (3) HOPPE-SEYLER-THIERFELDER "Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse" Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg Bd. V, 358 (1953)
- (4) NORTHROP, J.H. and M. KUNITZ J. gen. Physiol. 16, 295 (1932)
- (5) DRAGSTEDT, C.A. Science N. Y. 98, 131 (1943)
- (6) BAMANN, E. und K. MYRBÄCK "Methoden der Fermentforschung" Georg Thieme Verlag, Leipzig 2065, 1325 (1941)
- (7) GROSSE-BROCKHOFF, F. "Einführung in die pathologische Physiologie" Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 232 (1950)
- (8) GROSS, O. Arch. exp. Path. 58, 157 (1908)
- (9) BÖRNGEN, S., K. GEBLER und F. HAUSCHILD Pharmazie 10, 230 (1955)
- (10) HORSCH, W. u. K. KÖNIG Pharmazie 11, 230 (1956)
- (11) BAUMANN, J. Z. f. exp. Med. 91, 120 (1933)
- (12) RONA, P. u. H. KLEINMANN Biochem. Z. 241, 283 (1931)
- (13) KRIJGSMANN, B.J. Hoppe-Seyler Z. 230, 190 (1934)
- (14) FOREMAN, F.W. Biochem. J. 14, 451 (1920)
- (15) WILLSTÄTTER, R. und E. WALDSCHMIDT-LEITZ Ber. dtsch. chem. Ges. 54, 2988 (1921)

- (16) WILLSTÄTTER, R.,
E. WALDSCHMIDT-LEITZ,
S. DUNAITURRIA und
G. KÜNSTNER
Z. physiol. Chem. 161, 191 (1926)
- (17) Dr. VOGEL
Kali-Chemie Hannover
persönliche Mitteilung
- (18) BAMANN, E. u. K. MYRBÄCK
"Methoden der Fermentforschung"
Georg Thieme Verlag, Leipzig
2925 (1941)
- (19) WALLENFELS, K.
Med. Klin. 3, 114 (1954)
- (20) WINNICK, T., A.R. DAVIS und
A.F. BLOOD
J. gen. Physiol. 23, 301 (1940)
- (21) BALZER, E. u. K. WERNER
Med. Klin. 3, 118 (1954)
- (22) LEUBNER, H.
Arch. f. Verdauungskr. 63, 14 (1938)
- (23) VINAZZER, H.
Wiener Med. Wschr. 33, 618 (1953)
- (24) SÖRENSEN, S.P.L.
Biochem. Z. 7, 45 (1908)
- (25) LINDERSTRÖM-LANG, K.
Hoppe-Seyler Z. 173, 32 (1928)
- (26) NADEAU, G.F. und
L.E. BRANCHEN
J. amer. chem. Soc. 57, 1363 (1935)
- (27) SLYKE, D.D. van
Ber. dtsch. chem. Ges. 43, 3170 (1910)
- (28) WARBURG, O., W. CHRISTIAN
und A. GRIESE
Biochem. Z. 282, 157 (1935)
- (29) ANSON, M.L.
J. gen. Physiol. 22, 79 (1938)
- (30) FOLIN, O. and
V. CIOCALTEU
J. biol. Chem. 73, 627 (1927)
- (31) GOWENLOCK, A.H.
Biochem. J. 53, 274 (1953)
- (32) HUNT, J.N.
Biochem. J. 42, 104 (1948)
- (33) BERGSTERMANN, H.
Münch. Med. Wschr. 19, 560 (1954)
- (34) WALLENFELS, K.
Biochem. Z. 321, 189 (1950)

- (35) TOMARELLI, R.M.,
J. CHARNEY und
M.L. HARDING
J. Lab. clin. Med. 34, 428 (1949)
- (36) SCHWERT, G.W.
J. biol. chem. 174, 411 (1948)
- (37) SPEYER, E.
Arzneimittel-Forschung 3, 309 (1953)
- (38) ABELIN, I. und
H. PFISTER
Klin. Wschr. 30, 1036 (1952)
- (39) BALZER, E. und
K. WERNER
Med. Klin. 29, 1036 (1953)
Münch. Med. Wschr. 47, 1386 (1954).

Zum Schluß möchte ich Herrn Professor
Dr. med. K. Z i p f danken für die freund-
liche Überlassung des Themas und für die je-
derzeit bereitwillig gewährte Unterstützung.

Ebenfalls gebührt Dank den Herren Assistenten,
besonders Herrn Dr. W. S c h l e m m e r für
die im Verlauf der Arbeit gewährte Unterstüt-
zung und Beratung.

Lebenslauf

Ich wurde am 22. Juni 1932 als Sohn des Regierungsveterinärates Wolfgang Koller und seiner Ehefrau Clara, geb. Henrich, in Pfullendorf (Landkreis Überlingen/Bodensee) geboren. Nach vier Klassen Volksschule besuchte ich zuerst das Suso-Gymnasium in Konstanz und ab Herbst 1946 das Kolleg St. Blasien im Schwarzwald. Hier legte ich auch im Jahre 1952 die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1952 begann ich das tiermedizinische Studium an der Fakultät für Tiermedizin der Universität München. Nach dem Physikum studierte ich zwei Semester an der Tiermedizinischen Fakultät der Universität Zürich. Im Jahre 1957 beendete ich meine Ausbildung mit dem tierärztlichen Staatsexamen in München.

